

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願番号

特開平10-42874

(43)公開日 平成10年(1998)2月17日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 9/12			C 1 2 N 9/12	
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数30 O L (全 27 頁)

(21)出願番号	特願平8-200446	(71)出願人 000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成8年(1996)7月30日	(72)発明者 小松原 秀介 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者 北林 雅夫 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者 上村 秀喜 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物

(57)【要約】

【課題】核酸の増幅効率が優れた耐熱性DNAポリメラーゼ組成物を提供する。

【解決手段】改変前の3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼに比べて、0~5%である3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ(第1 DNAポリメラーゼ)および3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100~6%である3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ(第2 DNAポリメラーゼ)を含み、第1 DNAポリメラーゼおよび第2 DNAポリメラーゼが少なくとも30塩基/秒であるDNA合成速度、pH 8.8にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物である。該組成物を使用することにより長鎖核酸の増幅も可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第1DNAポリメラーゼ）および3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100～6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第2DNAポリメラーゼ）を含み、第1DNAポリメラーゼおよび第2DNAポリメラーゼが、少なくとも30塩基/秒であるDNA合成速度、pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項2】 第2DNAポリメラーゼの活性が、第1DNAポリメラーゼの活性よりも小さい請求項1項記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項3】 第1DNAポリメラーゼ2、5単位につき、第2DNAポリメラーゼが0.02～0.1単位である請求項1記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項4】 第1DNAポリメラーゼの3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が、改変前の耐熱性DNAポリメラーゼの3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性に比べて、約1%以下に低下したものである請求項1項記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項5】 第1DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1項記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

【請求項6】 第1DNAポリメラーゼが下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90kDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項7】 第1DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

【請求項8】 第1DNAポリメラーゼが、配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項9】 第1DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項10】 第1DNAポリメラーゼが、配列番号2の第143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項11】 第1DNAポリメラーゼが、配列番号2の第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項12】 第1DNAポリメラーゼが、配列番号2の第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項13】 第1DNAポリメラーゼが、配列番号2の第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項14】 第2DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ

3 である請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 作用：DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。
 DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒
 熱安定性：pH 8. 8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。
 至適温度：約75°C
 分子量：88~90kDa
 アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列
 【請求項15】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100~6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。
 DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒
 熱安定性：pH 8. 8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。
 アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁、D_X、EX₁、モチーフのうち、X₁、X₂ およびX₃ の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列
 【請求項16】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100~6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。
 DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒
 熱安定性：pH 8. 8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。
 アミノ酸配列：配列番号2の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列
 【請求項17】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100~6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。
 DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒
 熱安定性：pH 8. 8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。
 至適温度：約75°C
 分子量：88~90kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはリジンに置換したアミノ酸配列または第144番目のスレオニンをバリンに置換したアミノ酸配列
 【請求項18】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 【請求項19】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをグルタミン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 【請求項20】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 【請求項21】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをグルタミンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 【請求項22】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをリジンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 【請求項23】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 20 30 40 50 【請求項24】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第144番目のスレオニンをバリンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
 【請求項25】 下記第1 DNAポリメラーゼおよび下記第2 DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物。
 第1 DNAポリメラーゼ：
 作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0~5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。
 DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒
 熱安定性：pH 8. 8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。
 至適温度：約75°C
 分子量：88~90kDa
 アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、
 50 第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタ

ミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

第2 DNAポリメラーゼ：

作用：DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも120塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90kDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列

または

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100%～30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも120塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはジンに置換したアミノ酸配列または第144番目のスレオニンをパリニンに置換したアミノ酸配列

【請求項26】 DNAを錠型とし、プライマー、dNTPおよび請求項1～25のいずれか1項記載の核酸增幅用DNAポリメラーゼ組成物を含む試薬を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を作成することを特徴とする核酸増幅法。

【請求項27】 プライマーが2種のオリゴヌクレオチドであって、1方は他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である請求項26記載の核酸増幅法。

【請求項28】 加熱および冷却を繰り返す請求項26記載の核酸増幅法。

【請求項29】 請求項1～25項のいずれか1項記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物、2価イオン、1価イオン、プライマー、dNTPおよび緩衝液を含む核酸増幅用試薬。

【請求項30】 請求項1～25項のいずれか1項記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンおよび/またはカリウムイオン、1方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTP、BSAおよび非イオン界面活性剤および緩衝液を含む核酸増幅用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物および該組成物を含む核酸増幅用試薬および該試薬を用いる核酸増幅法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来から、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等の核酸を増幅する技術を用いる耐熱性DNAポリメラーゼに関する研究が多くなされている。PCR反応に用いられる耐熱性DNAポリメラーゼは、主としてサーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*) 由来のDNAポリメラーゼ (Tthポリメラーゼ) やサーマス・アカチカス (*Thermus aquaticus*) 由来のDNAポリメラーゼ (Taqポリメラーゼ) などが用いられてきた。また、超好熱始原菌由来のDNAポリメラーゼ、たとえばバイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (Pfuポリメラーゼ、WO92/09689、特開平5-328969公報)、サーマス・リトラリス (*The rmococcus littoralis*) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (Tliポリメラーゼ、特開平6-7160号公報) などが知られている。

【0003】 本発明者は熱安定性やDNA合成速度に優れたバイロコッカス (*Pyrococcus*) s p. KOD1由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (KODポリメラーゼ、特開平7-298879号公報)を見い出した。さらに、本発明者はバイロコッカス (*Pyrococcus*) s p. KOD1由来のポリメラーゼのDNAの合成速度と熱安定性を保持したまま、改変前の該酵素に比べて3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を少なくとも5%以下に低下させた改変酵素を作り出すことに成功した。該酵素は、DNA合成速度が少なくとも30塩基/秒であって、pH 8.8 (25°Cでの測定値、95°CにてpHを測定することは困難である。)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる耐熱性DNAポリメラーゼであって、改変前の酵素に比べて、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が少なくとも5%以下に低下した酵素である。該酵素を用いることにより、改変前の酵素を用いるよりも増幅効率が上昇することも見い出した。

【0004】 一方、長鎖核酸を増幅する方法の1つとして、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠くTaqポリメラーゼ (KlenTaq-278) と3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するPfuポリメラーゼまたはTliポリメラーゼまたはこれらの変異酵素を混合したDNAポリメラーゼ組成物を用いて、PCRを行う方法が報告されている (Barns, W.M. (1994) Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 2216-2220)。また、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示さないTthポリメラーゼと3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示すPfuポリメラーゼまたはTliポリメラーゼ、サーモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼを混合したポリメラーゼ組成物を用いて、PCRを行う方法が報

告されている(特開平8-38198号公報)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの組成物は1種類のDNAポリメラーゼを用いる場合に比べて、増幅効率は改善されるものの、熱安定性やDNA合成速度の異なる2種類のDNAポリメラーゼを用いており、決して充分な増幅効率とはいえず、より増幅効率が優れた方法が待ち望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者は鋭意検討した結果、核酸増幅用のDNAポリメラーゼ組成物であって、第1DNAポリメラーゼと、ポリメラーゼ活性単位で測定すると第1DNAポリメラーゼよりも少量の第2DNAポリメラーゼの組み合わせからなり、熱安定性およびDNA合成速度ほぼ等しいDNAポリメラーゼ、具体的には前記第1DNAポリメラーゼが天然に存在する該酵素に比べて、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が0~5%である改変された耐熱性DNAポリメラーゼであり、そして前記第2DNAポリメラーゼが天然に存在する3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ、または天然に存在する該酵素に比べて、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が100~6%である改変されたDNAポリメラーゼよりなる群から選択されるDNAポリメラーゼであるDNAポリメラーゼ組成物を用いることにより、増幅効率の優れたPCRが行えることを見い出し、本発明に到達した。

【0007】すなわち、本発明は改変前の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0~5%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼを用いることにより、増幅効率の優れたPCRが行えることを見い出し、本発明に到達した。

【0007】すなわち、本発明は改変前の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100~6%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ(第1DNAポリメラーゼ)および3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100~6%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ(第2DNAポリメラーゼ)を含み、第1DNAポリメラーゼおよび第2DNAポリメラーゼが、少なくとも30塙基/秒であるDNA合成速度、pH 8.8(25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物である。

【0008】また、本発明はDNAを錆型とし、プライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸増幅法である。

【0009】さらに、本発明は1方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物、2価イオン、1価イオンおよび緩衝液を含む核酸

増幅用試薬である。

【0010】

【発明の実施態様】

【0011】本発明の第1DNAポリメラーゼは、改変前の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0~5%、好ましくは1%以下に低下した3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素である。

【0012】このような第1DNAポリメラーゼとしては、アミノ酸配列が配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する酵素がある。その一例としては、配列番号2の141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の141番目のアスパラギン酸と143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置換した酵素、配列番号2の311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した酵素などがあげられる。また、配列番号142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した酵素も含まれる。

【0013】本発明の第1DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用: DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0~5%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度: 少なくとも30塙基/秒

熱安定性: pH 8.8(25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

【0014】本発明の第1DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用: DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0~5%である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度: 少なくとも30塙基/秒

熱安定性: pH 8.8(25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度: 約75°C

分子量: 88~90 KDa

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0015】本発明の第1DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNA

ポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

【0016】本発明の第2DNAポリメラーゼは、3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである。このような第2DNAポリメラーゼとしては、アミノ酸配列が配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する酵素または配列番号2に記載のアミノ酸配列の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する酵素がある。その一例としては、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはリジンに置換したアミノ酸配列、または第144番目のスレオニンをバリンに置換した酵素などがあげられる。

【0017】本発明の第2DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90kDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列

【0018】本発明の第2DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3'～

5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソI (EXO I) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁、D_X、EX_Xモチーフのうち、X₁、X₂およびX₃、少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

なお、3'～5'エキソヌクレアーゼ活性をもつDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中には、このエキソヌクレアーゼに関して高度に保存されたアミノ酸領域が知られている (EXO I, EXO II, EXO III, 図4)。エキソI (EXO I) 領域にはX₁、DX_X、EX_Xモチーフが存在し、これらのアミノ酸、D (アスパラギン酸) とE (グルタミン酸) はエキソヌクレアーゼ活性に必須であることが知られている。

【0019】本発明の第2DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0020】本発明の第2DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88～90kDa

アミノ酸配列：配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、またはリジンに置換したアミノ酸配列、または第144番目のスレオニンをバリンに置換したアミノ酸配列

【0021】第1DNAポリメラーゼおよび第2DNAポリメラーゼのDNA合成速度は少なくとも30塩基/

秒、好ましくは1000～1200塙基/秒であって、pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の活性を保持できる耐熱性DNAポリメラーゼである。本発明の第1DNAポリメラーゼおよび第2DNAポリメラーゼは、KODポリメラーゼまたは該酵素の変異体であることが好ましい。

【0022】本発明では、第2DNAポリメラーゼの活性が、第1DNAポリメラーゼの活性よりも小さいことが好ましく、第1DNAポリメラーゼ2.5単位につき、第2DNAポリメラーゼが0.02～0.1単位であることが好ましい。

【0023】これらの変更された酵素を製造する方法としては、例えば天然型KODポリメラーゼをコードする遺伝子に変異を導入して、蛋白工学的手法により、天然型KODポリメラーゼに比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した新規な酵素を製造する方法がある。

【0024】変異を導入するためのKODポリメラーゼをコードする遺伝子は特に限定されないが、本発明の一実施態様は、バイロッカス(*Pyrococcus*) sp. KOD由来の配列表・配列番号3に記載の遺伝子を用いた。

【0025】本発明の別一実施態様は、配列番号1に記載されたアミノ酸配列をコードする遺伝子に変異を導入して、天然型KODポリメラーゼに比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した新規な酵素を製造する。

【0026】天然型KODポリメラーゼ遺伝子に変異を導入する方法は、既知のいかなる方法でも用いることができる。例えば天然型KODポリメラーゼ遺伝子DNAと変異源となる薬剤を接触させる方法や紫外線照射による方法などから、蛋白工学的な手法、例えばPCR法や部位特異的変異などの方法を用いることができる。また、遺伝子修復機構が欠損されたため、高頻度で遺伝子に変異が起こる大腸菌を用いて、*in vivo*での変異の導入も可能である。本発明で使用したカメレオン site-directed mutagenesisキット(ストラタジーン社製)とは、(1)目的とする遺伝子を挿入したプラスミドを性質させ、該プラスミドに変異プライマーと選択プライマーとアーニーリングさせる。(2)次にDNAポリメラーゼでDNA合成を行った後、ライゲースにてライゲーション反応を行う。(3)選択プライマー中に存在しないが、錆型となるプラスミドに存在する制限酵素でプラスミドを切断し、変異の挿入されていないDNAを切断する。(4)次に残されたプラスミドで大腸菌を形質転換する。(5)形質転換体から変異プラスミドを調製し、(3)、(4)を繰り返し、目的とする変異の挿入されたプラスミドを得る方法である。

【0027】上記のようにして得られた変異ポリメラーゼ遺伝子を、例えばpLED-M1、pBlue script vectorなどのベクターに挿入し、例えば大腸菌に形質転

換した後、アンビシリーン等の薬剤を含む寒天培地に塗布し、コロニーを形成させる。コロニーを栄養培地、例えばLB培地や2×YT培地に接種し、37°Cで12～20時間培養した後、菌体を破碎し粗酵素液を抽出する。菌体を破碎する方法は、公知のいかなる手法を用いてもよく、例えば超音波処理やガラスビール破碎のような物理的破碎法やリゾチームのような溶菌酵素を用いることができる。この粗酵素を熱処理、例えば80°C、30分間処理し、宿主由来のポリメラーゼを失活させ、DNAポリメラーゼ活性を測定する。次に3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定し、両者の活性比率を天然型KODポリメラーゼを比較することにより、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の低下した酵素をスクリーニングすることができる。

【0028】上記方法により選抜された菌株から精製DNAポリメラーゼを取得する方法は、公知のいかなる手法を用いてもよく、例えば下記方法がある。栄養培地に培養して得られた菌体を回収した後、酵素活性は物理的破碎法により破碎抽出して粗酵素液を得る。得られた粗酵素抽出液は熱処理、例えば80°C、30分間処理し、その後、硫安沈殿によりKODポリメラーゼ画分を回収する。この粗酵素液をセファデックスG-25(ファルマシア・バイオテク)ゲル濃過等の方法により脱塩を行うことができる。この操作の後、Qセラロース、ヘパリシセラロースなどのカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。この精製酵素標品はSDS-PAGEによってほぼ単一のバンドを示す程度に純化される。

【0029】本発明において、DNA合成活性とは錆型DNAにアーニーされたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基にデオキシリボヌクレオシド5'-トリホスフェートの2'-ホスフェートを共有結合せしめることにより、デオキシリボ核酸にデオキシリボヌクレオシド5'-モノホスフェートを錆型依存的に導入する反応を触媒する活性をいう。

【0030】その活性測定法は、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行う。本発明では、下記A液2.5μl、B液およびC液各5μlおよび滅菌水10μlをエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合した後、上記酵素液5μlを加えて75°Cで10分間反応する。その後、氷冷し、E液50μl、D液1000μlを加えて、攪拌後、さらに10分間氷冷する。この液をガラスフィルター(ワットマンGF/Cフィルター)で濾過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)で計測し、錆型DNAへのヌクレオチドの取り込みを測定する。酵素活性の1単位はこの条件下で30分あたり10nモルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とする。

A : 40 mM Tris-HCl (pH 7.5)

16 mM 塩化マグネシウム

15 mM ジチオスレイトール

1000 µg/ml BSA

B : 2 µg/µl 活性化牛胸腺DNA

C : 1.5 mM dNTP (250 cpm/pmol [³H] dTTP)

D : 20% トリクロロ酢酸 (2 mM ピロリン酸ナトリウム)

E : 1 µg/µl キャリアーDNA

【0031】本発明において、3' - 5' エキソヌクレオチド活性を有する。

アーゼ活性とは、DNAの3'末端領域を切除し、5' -モノヌクレオチドを遊離する活性をいう。その活性測定法は、50 µlの反応液(20 mM Tris-HCl(pH 8.8 at 25°C), 10 mM KCl, 6 mM 硫酸アンモニウム, 1 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 5 µg トリチウムラベルされた大腸菌DNA)を1.5 mlのエッペンチューブに分注し、DNAポリメラーゼを加える。7.5°Cで10分間反応させた後、氷によって反応を停止し、次にキャリアーとして、0.1%のBSAを50 µl加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を100 µl加え混合する。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心沈殿を分離する。上清1000 µlの放射活性を液体シンチレーションカウンター(バッカード社製)で計測し、酸可溶性分に遊離したヌクレオチド量を測定する。

【0032】本発明において、DNA合成速度とは、単位時間当たりのDNAの合成量をいう。その測定法はDNAポリメラーゼの反応液(20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 8 mM 塩化マグネシウム、7.5 mM ジチオスレイトール、100 µg/ml BSA, 0.1 mM dNTP, 0.2 µCi [α -³²P]dCTP)を、プライマーをアーニーリングさせたM13mp1 1本鎖DNAと7.5°Cで反応させる。反応停止は等量の反応停止液(50 mM 水酸化ナトリウム、10 mM EDTA、5% フィコール、0.05% プロモフェノールブルー)を加えることにより行う。上記反応にて合成されたDNAをアルカリアガロースゲル電気泳動にて分画した後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィを行う。DNAサイズマーカーとしてはラベルしたλ/HindIIIを用いる。このマーカーのバンドを指標として合成されたDNAのサイズを測定することによって、DNA合成速度を求める。

【0033】本発明において、熱安定性とは、pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理での残存活性を意味する。

【0034】本発明の改良前の耐熱性DNAポリメラーゼは、鹿児島県・宝島にて単離した超好熱始菌の1種であるバイココッカス(*Pyrococcus* sp.) KOD由来の酵素である。該酵素を生産するKODの酵素の性質は、特開平7-298879号公報に記載される。該酵素は上記菌株を培養して生産される。該酵素は下記理化学的性質を有する。

作用: DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレ

DNA合成速度: 少なくとも120 基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度: 約7.5°C

分子量: 88 ~ 90 kDa

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列

【0035】本発明の核酸増幅法では、上記DNAポリメラーゼ組成物を使用して、DNAを錆型とし、プライマー、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成する方法である。

【0036】本発明の核酸増幅法の1種であるPCR法では、まず、試料中の核酸、特に長鎖核酸が2本鎖である場合には熱により変性させ、1本鎖とする。長鎖核酸が完全な鎖分離をすれば、プライマーのアーニーリングおよび伸長反応を妨げるのである。次いで該1本鎖を錆型として該錆型に相補的なプライマー、好ましくは1方が他のDNA伸長生成物に相補的であるプライマーおよびdNTPを本発明のDNAポリメラーゼ組成物を用いてPCR反応液中にて反応させる。

【0037】反応温度は、2段階の温度サイクルを使用し、増幅される核酸が変性される高温と変性された核酸にプライマーがアニールしてプライマー伸長が起こる低温とを交互に繰り返す。通常、94°Cで0.5 ~ 1分間

→ 68°Cで0.5 ~ 10分間を2.5 ~ 4.0回繰り返す。2つのプライマーは錆型核酸配列の反対の末端にアーニールし、そして各プライマーの伸長生成物が錆型核酸配列の相補的なコピーであり、かつ、その相補体から分離された時に他のプライマーにハイブリダイズすることができるよう方向で錆型核酸にアーニールする。反応時間は、伸長反応が鎖の合成を完結するに十分な時間であることが好ましい。20 kbより長い核酸の増幅には、少なくとも10 ~ 20分間のアーニーリングおよび伸長時間が好ましい。

【0038】長鎖核酸は増幅の間に分解に対して保護されることができ好ましく、例えばグリセロール、ジメチルスルホキシド(DMSO)などを使用する。

【0039】誤って取り込まれたヌクレオチドの存在は、鎖の合成を早々と終わらせ、次の回の増幅に向かう錆型鎖の数を減少させ、長鎖核酸の増幅効率を低下させ

てします。しかしながら、本発明ではDNAポリメラーゼ活性に加えて、反応液中に少量の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が存在することにより、プライマー伸長生成物の合成の間に誤った取り込まれたヌクレオチドを除去し、なお、優勢的なポリメラーゼ活性により完全な鎖合成を可能とします。

【0040】反応緩衝液のpHと組成、塩（2価イオンおよび1価イオン）ならびにプライマーの設計は、長鎖核酸の増幅効率にとって重要である。PCR試薬の調製は、通常、変性段階前の室温で行うから、別なプライマーや一部の相同的な核酸配列へのプライマーの結合を引き起こすことがある。この非特異的なプライマーの結合からも伸長生成物が形成されると、長鎖生成物の増幅効率を減少させることになる。このような特異的結合を防ぐためには、高温になってから、酵素を添加するなどのいわゆるホットスタート法が好ましい。

【0041】本発明のDNAポリメラーゼは、その活性を維持するために、2価イオン、例えばマグネシウムイオンおよび1価イオン、例えばアンモニウムイオンおよび/またはカリウムイオンを共存させることが好ましい。また、核酸増幅用反応液には、緩衝液およびこれらイオンを含むとともに、BSA、非イオン界面活性剤、例えばTriton X-100および緩衝液が存在していてもよい。

【0042】本発明の核酸増幅用試薬は、1方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンおよび/またはカリウムイオン、BSAおよび非イオン界面活性剤および緩衝液を含む。本発明では、第2DNAポリメラーゼの活性は、第1DNAポリメラーゼの活性よりも小さいことが好ましく、第1DNAポリメラーゼ2、5単位につき、第2DNAポリメラーゼが0、02～0、1単位であることが好ましい。本発明の試薬には必要により、補助溶解剤、例えばグリセリン、DMSO、ポリエチレングリコールなどを含んでいてよい。

【0043】緩衝液としては、Tris緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン（トリシン緩衝液）、N-ビス（ヒドロキシエチル）グリシン（バイシン緩衝液）などが使用される。最適の緩衝液およびpHは使用するDNAポリメラーゼに依存する。本発明ではKODポリメラーゼおよび該酵素の変異体を使用する場合は、pH 7.5～9.2（25°Cにおいて、1.0 mM～5.0 mM、好ましくは2.0～1.20 mMである。2価カチオンはマグネシウムイオンが好ましく、塩化マグネシウムなどが使用される。その濃度は1～2 mMであることが好ましい。1価カチオンはアンモニウムイオンまたはカリウムイオンが好ましく、硫酸アンモニウム、グルタミン酸カリウム、酢酸カリウムなどが使用される。

それらの濃度は2～5.0 mMであることが好ましい。プライマーは2種のオリゴヌクレオチドであって、1方は他方のDNA伸長生成物に相補的であるプライマーであることが好ましい。その濃度は、0.2～1 μMであることが好ましい。

【0044】次に、実施例を用いて本発明を詳細に説明する。

参考例1

超好熱始原菌KOD由来のDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

鹿児島県宝島にて単離した超好熱始原菌KOD1株を9.5°Cにて培養後、菌体を回収した。得られた菌体をから常法に従い、超好熱始原菌KOD1株の染色体DNAを調製した。バイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)由来のDNAポリメラーゼ(*PhuP*リメラーゼ)の保存領域アミノ酸配列に基づき、2種のプライマー(5'-CGATTAGTAGTCGCAATCGSSGCCGA-3'および5'-AGTTTATTCGAGCTT-3')を合成した。この2種のプライマーを使用し、調製したDNAを錆型として、PCR反応を行った。

【0045】PCR増幅DNA断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を決定した後、この増幅DNA断片をプローブとして、KOD1株染色体DNA制限酵素処理産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行い、DNAポリメラーゼをコードする断片のサイズを求めた（約4～7 Kbp）。さらに、この大きさのDNA断片をアガロースゲルから回収し、プラスミドpBS（ストラタジーン社製）に挿入し、これらの混合物より大腸菌(*E.coli JM109*)を形質転換して、ライブライアーゼを作製した。サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行い、上記ライブライアーゼから、KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子を含有すると考えられるクローニング株(*E.coli JM109/pSBKOD1*)を取得した。

【0046】取得したクローニング株、(*E.coli JM109/pSBKOD1*)よりプラスミド、pSBKOD1を回収し、常法に従い、塩基配列を決定した。さらに求められた塩基配列からアミノ酸配列を推定した。KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子は5010塩基からなり、1670個のアミノ酸がコードされていた（配列番号1）。

【0047】完全なポリメラーゼ遺伝子を作成するため、2箇所の介在配列（1374～2453 bp : 2708～4316 bp）をPCR融合法により取り除いた。PCR融合法では、クローニング株より回収したプラスミドを錆型に、3組のプライマーを組み合わせて、各々PCRを行い、介在配列を除いた3断片を増幅した。この際、PCRに用いるプライマーは、他の断片と結合する側に結合相手と同様な配列がくるように設計した。また、両端には別々な制限酵素サイト（N末端側：*Eco R V*、C末端側：*Bam H I*）が創出されるように設計

した。次いで、PCR増幅断片中、構造上中央に位置する断片と、N末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。また、同様に構造上、中央に位置する断片と、C末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。このようにして得られた2種の断片を用いて再度PCRを行い、介在配列を取り除かれ、N末端にEcoRI、C末端にBamHIサイトを有するKOD1株由来のDNAポリメラーゼをコードする完全な形の遺伝子断片を取得した。更に、同遺伝子をT7プロモーターで誘導可能な発現ベクター、pET-8c(Neo1)/BamHI1サイト、先に創出した制限酵素サイトを利用し、サブクローニングして、組換え発現ベクター(pET-p01)を得た。なお、E.coli BL21(DE3)/pET-p01は、生命工学工業研究所へ寄託されている(FERM BP-5513)。

【0048】参考例2

KODポリメラーゼ遺伝子のサブクローニング

耐熱性DNAポリメラーゼを変更するために、プラスミドpET-p01からKODポリメラーゼ遺伝子を切り出し、pBluescriptにサブクローニングした。すなわちpET-p01を制限酵素XbaIとBamHI(東洋紡製)で切断し、約2.3kbのKODポリメラーゼ遺伝子を切り出した。次にこのDNA断片をライゲーションキット(東洋紡製Ligation high)を用いて、XbaIとBamHIで切断したプラスミドpBluescript SK(-)と連結した。次に、市販のコンピテントセル(東洋紡製competent high JM109)を用いて形質転換を行った。100μg/mlのアンビシリンを含んだLB寒天培地(1%バクタトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、ギブコ社製)で30℃で16時間培養した大腸菌JM109(pKODDA) (500ml坂口ラスコ使用)を接種し、35℃で12時間通気搅拌培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、400mlの破碎緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 80mM KCl, 5mM 2-メルカプトエタノール, 1mM EDTA)に懸滴後、超音波処理によって菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、細胞破碎液を85℃にて30分処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。さらにポリエチレンミンを用いた除核酸処理、硫安分離、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液(50mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM 塩化カリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Tween20, 0.1%ノニデットP40, 50%グリセリン)に置換し、変更型耐熱性DNAポリメラーゼ(DA)を得た。上記精製工程のDNAポリメラーゼ活性測定は以下の操作を行った。また、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行った。

【0049】参考例3

変更型遺伝子(DA)の作製及び変更型耐熱性DNAポリメラーゼ(DA)の活性測定

(試薬)

A:	40 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
	16 mM	塩化マグネシウム
	1.5 mM	ジチオスレイトール
	100 μg/ml	BSA
B:	2 μg/μl	活性化仔牛胸腺DNA
C:	1. 5 mM	dNTP (2500cpm/pmol [³ H]dTTP)
D:	2.0%	トリクロロ酢酸(2mMピロリン酸ナトリウム)
E:	1 μg/μl	キヤリアーDNA

【0052】(方法) A液25μl、B液およびC液各5μlおよび滅菌水10μlをエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合した後、上記酵素液5μlを加えて75℃で10分間反応する。その後、冰冷し、E液50μl

* リメラーゼ(DA)の精製

参考例2で得られたプラスミドpKOD1を用いて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変更型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した(pKODDA)。作製はカマレオン site-directed mutagenesisキット(ストラタジーン社製)を用いた。方法は取扱説明書に準じて行った。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号7に記載のプライマーを用いた。なお、変異体の確認は塩基配列の解読を行った。得られたプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、JM109(pKODDA)を得た。

【0050】滅菌処理した100μg/mlのアンビシリンを含んだTB培地(Molecular Cloning, p. A. 2に記載)6Lを10Lジャーファーメーターに分注した。この培地に予め100μg/mlのアンビシリンを含んだ50mlのLB培地(1%バクタトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、ギブコ社製)で30℃、16時間培養した大腸菌JM109(pKODDA) (500ml坂口ラスコ使用)を接種し、35℃で12時間通気搅拌培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、400mlの破碎緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 80mM KCl, 5mM 2-メルカプトエタノール, 1mM EDTA)に懸滴後、超音波処理によって菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、細胞破碎液を85℃にて30分処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。さらにポリエチレンミンを用いた除核酸処理、硫安分離、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液(50mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM 塩化カリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Tween20, 0.1%ノニデットP40, 50%グリセリン)に置換し、変更型耐熱性DNAポリメラーゼ(DA)を得た。上記精製工程のDNAポリメラーゼ活性測定は以下の操作を行った。また、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行った。

【0051】

1. D液100μlを加えて、攪拌後、さらに10分間冰冷する。この液をガラスフィルター(ワットマンGF/Cフィルター)で濾過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーション

カウンター(パッカード社製)で計測し、鑄型DNAへのスクレオチドの取り込みを測定した。酵素活性の1単位はこの条件下で30分あたり1.0nmolのスクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とした。

【0053】参考例4

変異体(EA)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した(pKODEA)。選択プライマーとしては配列番号5に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号8に記載のプライマーを用いた。更に参考例3同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(EA)を得た。

【0054】参考例5

変異体(DEA)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて配列表2に記載のKODポリメラーゼの141番目のアスパラギン酸及び143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した(pKODDEA)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号6に記載のプライマーを使用した。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(DEA)を得た。

【0055】参考例6

変異体(D)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した(pKOND)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号9に記載のプライマーを用いた。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(D)を得た。

【0056】参考例7

変異体(YF)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて配列表2に記載のKODポリメラーゼの311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した(pKODYF)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号10に記載のプライマーを用いた。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(YF)を得た。

【0057】参考例8

改変型耐熱性DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の確認

上記参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(DA、EA、DEA、NDおよびYF)のエキソヌクレアーゼ活性を以下の方法にて測定した。対照として、天然型のKODポリメラーゼ(東洋紡製)を用いた。5.0μlの反応液(120mM Tris-HCl(pH8.8 at 25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アノモニウム, 1mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 5μg トリチウムラベルされた大腸菌DNA)を1.5mlのエッペンチューブに分注し、DNAポリメラーゼをそれぞれ2.5単位、5.0単位、10.0単位加えた。なお、天然型のKODポリメラーゼは0.25単位、0.5単位、1単位用いた。7.5°Cで10分間反応させた後、氷冷によって反応を停止し、次にキャリヤーとして、0.1%のBSAを5.0μl加え、さらには1.0%のトリクロロ酢酸、2%ビロリ酸ナトリウム溶液を1.000μlを加え混合した。氷上で1.5分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離した。上清1.000μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)で計測し、酸可溶性画分に遊離したスクレオチド量を測定した。図1に各DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNAの分解率を示した。この結果では改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(DEA、DA、EA)の3種類のポリメラーゼはエキソヌクレアーゼ活性が検出できなかった。また、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(ND)は天然型のKODポリメラーゼの約0.1%、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(YF)は約0.01%のエキソヌクレアーゼ活性を示した。

【0058】参考例9

熱安定性の確認

参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(DA、EA、DEA、NDおよびYF)の熱安定性を以下の方法にて測定した。精製した改変型DNAポリメラーゼ5単位を1.000μlの緩衝液(20mM Tris-HCl pH8.8 at 25°C, 10mM塩化カリウム, 10mM 硫酸アノモニウム, 2mM 硫酸マグネシウム, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/ml BSA, 5mM 2-メルカプトエタノール)に混合し、95°Cでブレインキュベートとした。この混合液から経時的に試料を採取し、参考例3記載の方法にてポリメラーゼ活性を測定した。比較として、Taqポリメラーゼ(東洋紡製)および天然型KODポリメラーゼ(東洋紡製)も同様の操作を行った。図2に示したように、いずれの改変型耐熱性DNAポリメラーゼも天然型KODポリメラーゼと同様に、95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を示した。それに対してTaqポリメラーゼは15%以下の残存活性であった。

【0059】参考例10

DNA合成速度測定

50 参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラ

ゼ (D、EA、DEA、NDおよびYF) のDNA合成速度を以下的方法で測定した。精製した変形型DNAポリメラーゼ1単位を10μlの反応液(20mM Tris-HCl (pH7.5), 8mM 塩化マグネシウム, 7.5mM ジチオスレイトール, 100 μg/ml BSA, 0.1mM dNTP, 0.2 μCi [α-³²P]dCTP)で0.2 μgの配列番号15のプライマーをアニーリングさせたM13mp18.1本鎖DNAと7.5°Cで20秒、40秒、60秒間反応させた。反応停止は等量の反応停止液(50mM 水酸化ナトリウム, 10mM EDTA, 5% フィコール, 0.05% プロモフェノールブルー)を加えることにより行った。比較としてTaqポリメラーゼ(東洋紡製)および天然型のKODポリメラーゼ(東洋紡製)も同様の操作を行った。

【0060】上記反応にて合成されたDNAをアルカリアガロースゲル電気泳動にて分画した後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行った。DNAサイズマークとしてはラベルしたλ HindIIIを用いた。このマークのバンドを指標として合成されたDNAのサイズを測定することによって、DNA合成速度を求めた。その結果、いずれの変形型ポリメラーゼも天然型のKODポリメラーゼと同じに、約1.02塙基/秒の合成速度を有していた。それに対してTaqポリメラーゼは約60塙基/秒の合成速度であった。

【0061】参考例11

変形型遺伝子(1N)の作製および変形型耐熱性DNAポリメラーゼの精製
参考例2で得られたプラスミドpKOD1を用いて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁、DX₂、EX₃、モチーフのうち、X₁のイソロイシンをアバランギンに置換した変形型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子30をもつプラスミドを作製した(pKOD1N)。作製は*

(試薬)

A:	4.0mM	Tris-HCl (pH 7.5)
	1.6mM	塩化マグネシウム
	1.5mM	ジチオスレイトール
	1.00 μg/ml	BSA
B:	2 μg/μl	活性化牛胸腺DNA
C:	1.5mM	dNTP (2.50 cpm/pmol [³ H]dCTP)
D:	2.0%	トリクロロ酢酸 (2mM ピロリン酸ナトリウム)
E:	1 μg/μl	キヤリアーDNA

【0064】(方法) A液2.5μl、B液およびC液各5μlおよび滅菌水10μlをエッペンドルフチャーブに加えて攪拌混合後、上記熱処理液5μlを加えて75°Cで10分間反応する。その後、氷冷し、E液5.0μl、D液1.00 μlを加えて、攪拌後さらに10分間氷冷する。この液をガラスフィルター(ワットマンGF/Cフィルター)で通過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター(バッカド社製)で計測し、鏡型DNAへのヌクレオチドの取り込みを測定した酵素活性の1単位は

* カメレオンsite-directed mutagenesis キット(ストラタジーン社製)を用いた。方法は取扱説明書に準じて行った。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号15に記載のプライマーを用いた。なお、変異体の確認は塩基配列の解読を行った。得られたプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、JM109(pKOD1N)を得た。【0062】滅菌処理した1.00 μg/mlのアンピシリンを含んだLB培地(Molecular Cloning, p. A. 2に記載)6Lを10Lジャーファーメンターに分注した。この培地に予め1.00 μg/mlのアンピシリンを含んだ50mlのLB培地(1% バクトリートン、0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、ギブコ社製)で30°C、16時間培養した大腸菌JM109(pKOD1N) (500ml坂口ラスコ使用)を接種し、3.5°Cで12時間通気培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、4.00mlの破碎緩衝液(10mM Tris-HCl (pH8.0), 80mM KCl, 5mM 2-メルカプトエタノール, 1mM EDTA)に懸滴後、超音波処理によって菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、細胞破碎液を8.5°Cにて30分処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。さらにポリエチレンイミンを用いた除核酸処理、硫安分画、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液(50mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM 塩化カリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Tween20, 0.1% ノニデットP40, 50% グリセリン)に置換し、変形型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子30は、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行った。

【0063】

この条件下で30分あたり1.0 nモルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とした。

【0065】参考例12

変異体(1E)遺伝子の作製および変形型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁、DX₂、EX₃、モチーフのうち、X₁のイソロイシンをグルタミン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD1E)。選択プライマーとしては配列番号14に記載の

イマーを使用した。変異プライマーは配列番号16Cに記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(IE)を得た。

【0066】参考例13

変異体(1Q)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁、DX₁、EX₁、モチーフのうち、X₂のイソロイシンをグルタミンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD1Q)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号17に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(1Q)を得た。

【0067】参考例14

変異体(1D)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁、DX₁、EX₁、モチーフのうち、X₂のイソロイシンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD1D)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号18に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(1D)を得た。

【0068】参考例15

変異体(TV)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX₁、DX₁、EX₁、モチーフのうち、X₂のチロシンをパリンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD1TV)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号19に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(TV)を得た。

【0069】参考例16

変異体(1K)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX₁、DX₁、EX₁、モチーフのX₂のイソロイシンをリジンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD1K)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号21に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(1K)を得た。

【0070】参考例17

変異体(1R)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX₁、DX₁、EX₁、モチーフのX₂のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD1R)。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号20Cに記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(1R)を得た。

【0071】参考例18

改変型耐熱性DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の確認

上記参考例11～17で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(1N、1E、1Q、1D、1V、1Kおよび1R)のエキソヌクレアーゼ活性を以下の方法にて測定した。対照として、天然型のKODポリメラーゼ(東洋紡製)を用いた。5.0 μlの反応液(120mM Tris-HCl(pH8.8 at 25°C)、10mM KCl、6mM 硫酸アンモニウム、1mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、5μgトリチウムラベルされた大腸菌DNA)を1.5mlのエッペンチューブに分注し、上記DNAポリメラーゼをそれぞれ0.5ユニット、1ユニット、1.5ユニット加えて、75°Cで10分間反応させた。水冷によって反応を停止し、次にキャリヤーとして0.1%のBSAを5.0mI加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を1000μl加え混合した。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離した。上清1000μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定し。

【0072】図5に各DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNAの分解率を示した。更に天然型のKODポリメラーゼとのエキソヌクレアーゼ活性の比を図6に示した。このように本発明によれば様々な強度の3'～5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼが得られることを示した。天然型のKODポリメラーゼの3'～5'エキソヌクレアーゼ活性に対して、1Nは約9.5%、1Eは約7.6%、1Qは約6.4%、1Dは約5.2%、1Vは約4.8%、1Kは約3.0%、1Rは約0.9%の同活性を有していた。

【0073】参考例19

改変型DNAポリメラーゼのPCRでのDNA合成の正確性の測定

天然型のKODポリメラーゼ、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ1E、1D、1K、1RおよびTaqポリメラーゼについて、PCRでのDNA合成の正確性を以下の方法にて測定した。ブラスマドpUR288 (Current

Protocols in Molecular Biology 1.5.6C記載)を制限酵素 Sca I で切断した。このプラスミドを 1ng 用いて PCRを行った。反応終了後、5 μl の反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、約 5.3 kb のターゲットの増幅を確認した。残りの反応液をフェノール/クロロホルム処理し、次にエタノール沈殿を行った。沈殿を乾燥後 5 μl の H_2O とバッファー (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) に溶解した。さらに制限酵素 Sca I (東洋紡製) を 10 ユニット加えて、37°C で 16 時間反応させた。アガロースゲル電気泳動にて目的の増幅産物を分離し、その部分のアガロースを切り出した。このアガロースからジンクリーン 2 (BIOLOI社製) を用いて DNA を精製した。精製した DNA 10 ng を 10 μl になるように TE バッファー (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA) で希釈し、ライゲーションキット (東洋紡製 Ligations kit high) の反応液 10 μl を加えて 16°C で 30 分間反応した。次に市販のコンピーテントセル (東洋紡製 competent high JM109) を用いて形質転換を行った。*

* [0074] 100 μg/皿のアンビシリン、1mM のイソプロピルチオ-β-ガラクトシド (IPTG, ナカライテク社製)、0.7%の L-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド (X-gal (ナカライテク社製)) を含む L-BSA 寒天培地 (1% バクトリリブト、0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、1.5% 寒天、ギブコ社製) で 35°C で 16 時間培養し、コロニーをカウントした。pUR288 には lacZ 遺伝子 (β-ガラクトシダーゼ) が存在する。従って、PCR 中の DNA 合成が正確に行われた場合、上記寒天培地では青いコロニーを形成する。逆に DNA 合成中に誤りが起こり、lacZ 遺伝子のコードする β-ガラクトシダーゼ活性が低下あるいは欠失した場合、薄い青色ないしは白色のコロニーを形成する。この薄い青コロニーと白コロニーを異変コロニーとして、各酵素を用いた場合の変異率 (%) を表 1 に示した。

【0075】

【表1】

	KOD	IE	ID	IK	IR	Taq
全ヨコ二二	2394	3287	4655	2828	1157	2831
変異ヨコ二二	19	63	148	362	259	795
変異率 (%)	0.75	1.9	3.0	12.6	25.0	28.1

【0076】表 1 から明らかなように、本発明で得られた改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ E、ID、IK、IR は、天然型の KOD ポリメラーゼには劣るもの、Taq ポリメラーゼより変異率が低く、すなわち DNA 合成の正確性が高かった。

【0077】実施例 1

DNA ポリメラーゼ組成物を用いた PCR (ヒトゲノム)

改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ (DA、EA、DE A、ND、YF) と天然型 KOD ポリメラーゼの混合物を用いて PCRを行った。5.0 ml の反応液 (120mM Tris-HCl (pH 8.2 at 25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アノニウム、1mM MgCl₂、0.2mM dNTP, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 30ng のヒト胎盤由来のゲノム DNA (クローンテック社製)、10 ピコモルの配列表 1、1、2 記載のプライマー) に ND を 2、5 単位、KOD ポリメラーゼを 0.05 単位加えて PCR 反応を行った。サーマルサイクラーはパーキンエルマー社製のモデル P J 2000 を用いた。また反応条件は 94°C、30 秒 → 68°C、3 分を 30 サイクル行った。比較として改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ (ND)、Taq ポリメラーゼ (東洋紡製)、市販の DNA ポリメラーゼ混合物 (E x Taq (宝酒造社製) およびアドバンテージ T h (クローンテック社製) も同様にして、PCR 反応を行った。ただし、反応液組成は市販品に添付されている緩衝液を用い、ゲノム DNA 及びプライマーは全て上記と同量用いた。反応終了後、5 μl の反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、約 4 kb のターゲットの増幅を確認した。図 3 にアガロースゲル電気泳動の結果を示した。この結果、改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ (ND) と天然型 KOD ポリメラーゼの混合物を用いて、PCRを行った場合、市販のポリメラーゼ混合物に比べて良好な増幅であった。

【0078】

【発明の効果】本発明では、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方を使用することにより、増幅可能な錆型核酸の長さを大きく増大させることができる。また、熱安定性や DNA 合成速度がほぼ同じであって、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性のみが異なる 2 種以上の DNA ポリメラーゼの混合物を用いることにより、増幅効率の優れた核酸増幅を行うことができる。

【0079】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 5342

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 2 本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源: 超好熱始原菌

株名: KOD 1

配列の特徴

50 156-5165 P CDS

27

28

1 3 7 4 - 2 4 5 3 介在配列

配列

GCCTGAGGGC CTGGCGTTAT GGAGCTTGC AGTTGGCCG TACTCAAGA TCCCCGTTT 60
 ATAACCGAGA AAAATCGCA CCTATTACGA TCTCTCCCTG ATGTCGGTT TACATAAAG 120
 CCTGGATTGT TCTACAGAT TATGGGGAT GAAAG ATG ATC CTC GAC ACT GAC 173

Met Ile Leu Asp Thr Asp
 1 5

TAC ATA ACC GAG GAT GGA AAC CCT GTC ATA AGA ATT TTC AAG AAG GAA 221
 Tyr Ile Thr Glu Asp Glu Lys Pro Val Ile Arg Ile Phe Lys Lys Glu
 10 15 20

AAC GCC GAG TTT AAG ATT CAQ TAC GAC CCG ACT TTT GAA CCC TAC TTC 269
 Asn Glu Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg Thr Phe Glu Pro Tyr Phe
 25 30 35

TAC GCC CTC CTG AAG GAC GAT TCT GCC ATT GAG GAA GTC AAG AAG ATA 317
 Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile Glu Glu Val Lys Lys Ile
 40 45 50

ACC GCC GAG AGG CAC CGG ACG GTT GTC AGG GTT AAG CGG GTT GAA AAG 365
 Thr Ala Glu Arg His Glu Thr Val Val Thr Val Lys Arg Val Glu Lys
 55 60 65 70

GTT CAG AAG AAG TTC CTC CGG AGA CCA GTT GAG GTC TCG AAA CTC 413
 Val Glu Lys Lys Phe Leu Glu Arg Pro Val Glu Val Trp Lys Leu Tyr
 75 80 85

TTT ACT CAT CGG CAG GAC GTC CCA CGG ATA AGG GAC AAG ATA CGA GAG 461
 Phe Thr His Pro Glu Asp Val Pro Ala Ile Arg Asp Lys Ile Arg Glu
 90 95 100

CAT GGA GGA GTT ATT GAC ATC TAC GAG TAC GAC ATA CCC TTC CCC AAG 509
 His Glu Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr Asp Ile Pro Phe Ala Lys
 105 110 115

CGC TAC CTC ATA GAC AAG CGA TTA GTG CCA ATG GAA CGC GAC GAG 557
 Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Glu Leu Val Pro Met Glu Glu Asp Glu Glu
 120 125 130

CTG AAA ATG CTC GCC TTC GAC ATT GAA ACT CTC TAC CAT GAG CGC GAG 605
 Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr Leu Tyr His Glu Glu Glu
 135 140 145 150

GAG TTC CGC GAG CGG CCA ATC CTT ATG ATA ACC TAC GAC CGC GAC GAG 653
 Glu Phe Ala Glu Glu Pro Ile Leu Met Ile Ser Tyr Ala Asp Glu Glu
 155 160 165

CGG GCC AGG GTG ATA ATC TGG AAG AAC GTG CAT CTC CCC TAC GTT GAC 701
 Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val Asp Leu Pro Tyr Val Asp
 170 175 180

GTC GTC TCG AGG GAG GAC ATG ATA AAC CGC TTC CTC CGT GTT GTC 749
 Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys Arg Phe Leu Arg Val Val
 185 190 195

AAG GAG AAA GAC CGG GAC GTT CTC ATA ACC TAC AAC CGC GAC AAC TTC 797
 Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr Tyr Asn Glu Ile Asp Asn Phe
 200 205 210

GAC TTC CCC TAT CTG AAA AAC CGC CGT GAA AAG CTC CGA ATA AAC TTC 845
 Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu Lys Leu Glu Ile Asn Phe
 215 220 225 230

CCC CTC CGA AGG GAT CGA ACC GAG CGG AAG ATT CAG AGG ATG CGC GAC 893

29

Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys Ile Gln Arg Met Gly Asp
 235 240 245
 AGC TTT GCC GTC GAA GTG AAG GGA CGG ATA CAC TTC GAT CTC TAT CCT 941
 Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile His Phe Asp Leu Tyr Pro
 250 255 260
 GTG ATA AGA CGG ACG ATA AAC CTG CCC ACA TAC AGG CTT GAG CCC GTT 989
 Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Glu Ala Val
 265 270 275
 TAT GAA CCC GTC TTC CGT CAG CGG CAA GAG AAG GTT TAC CCT GAG GAA 1037
 Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu Lys Val Tyr Ala Glu Glu
 280 285 290
 ATA ACA CCA CGC TCG GAA ACC GGC GAG AAC CTT GAG AGA GTC CGC CGC 1085
 Ile Thr Pro Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn Leu Glu Arg Val Ala Arg
 295 300 305 310
 TAC TCG ATG GAA GAT CGG AAC GTC ACA TAC GAG CTT CGG AAG GAG TTC 1133
 Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr Glu Leu Gln Lys Glu Phe
 315 320 325
 CTT CGG ATG GAG CGC CAG CTT TCT CGC TTA ATC CGC CAG TCC CTC TGG 1181
 Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu Ile Gly Gln Ser Leu Trp
 330 335 340
 GAC GTC TCC CGC TCC ACC ACT CGC AAC CTC GTT GAG TGG TTC CTC CTC 1229
 Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu Val Glu Trp Phe Leu Leu
 345 350 355
 AGG AAG CGC TAT GAG AGG AAT GAG CTG GCC CGG AAC AAG CCC GAT GAA 1277
 Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala Pro Asn Lys Pro Asp Glu
 360 365 370
 AAG GAG CTG CGC AGA AGA CGG CAG ACC TAT GAA CGA CGC TAT GTA AAA 1325
 Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Glu Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys
 375 380 385 390
 GAG CCC GAG AGA GGG TTG TCG GAG AAC ATA GTG TAC CTA GAT TTT AGA 1373
 Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg
 395 400 405
 TGG CAT CCA CGC GAT ACG AAG GTT GTC GTC AAC CGG AAG CGG ATT ATA 1421
 Cys His Pro Ala Asp Thr Lys Val Val Val Lys Glu Lys Gly Ile Ile
 410 415 420
 AAC ATC ACC GAG GTT CAG GAA GGT GAC TAT GTC CTT CGG ATT GAC CGC 1469
 Asn Ile Ser Glu Val Glu Glu Asp Tyr Val Leu Glu Ile Asp Glu
 425 430 435
 TGG CAG AGA GTT AGA AAA GAA TGG GAA TAC GAC TAC AAA CGG GAG CTT 1517
 Trp Glu Arg Val Arg Lys Val Trp Glu Tyr Asp Tyr Lys Glu Glu Leu
 440 445 450
 GTA AAC ATA AAC CGG TTA AAG TGT AGC CCC ATT CAT AAC CTT CCC GTT 1565
 Val Asn Ile Asn Glu Leu Lys Cys Thr Pro Asn His Lys Leu Pro Val
 455 460 465 470
 GTT ACA AAC AAC GAA CGA CAA ACG AGA ATA AGA GAC AGT CTT CCT AAC 1613
 Val Thr Lys Asn Glu Arg Gln Thr Arg Ile Arg Asp Ser Leu Ala Lys
 475 480 485
 TCT TTC CTT ACT AAA AAA GTT AAG CGG AAG ATA ATA ACC ACT CCC CTT 1661
 Ser Phe Leu Thr Lys Lys Val Lys Glu Lys Ile Ile Thr Thr Pro Leu
 490 495 500

31	32
TTC TAT GAA ATA CGC AGA CGG ACA AGT GAG ATT CCA GAA GAA GAG	1709
Phe Tyr Glu Ile Gly Arg Ala Thr Ser Glu Asn Ile Pro Glu Glu Glu	
505 510 515	
GTT CTC AAC CGA GAG CTC CCT GCC ATA CTA TTG CCT GAA CGA AGC CTC	1757
Val Leu Lys Glu Leu Ala Gly Ile Leu Leu Ala Glu Gly Thr Leu	
520 525 530	
TTG AGG AAA GAC GTT GAA TAC TTT GAT TCA TCC CCC AAA AAA CGG AGG	1805
Leu Arg Lys Asp Val Glu Tyr Phe Asp Ser Arg Lys Arg Arg Arg	
535 540 545 550	
ATT TCA CAC CAG TAT CGT GTT GAG ATA ACC ATT CGG AAA GAC GAG GAG	1853
Ile Ser His Gln Tyr Arg Val Glu Ile Thr Ile Gly Lys Asp Glu Glu	
555 560 565	
GAG TTT AGG GAT GCT ATC ACA TAC ATT TTT GAG CGT TTG TTT CGG ATT	1901
Glu Phe Arg Asp Arg Ile Thr Tyr Ile Phe Glu Arg Leu Phe Glu Ile	
570 575 580	
ACT CCA ACC ATC TCG GAG AAG AAA CGA ACT AAC CCA GTC ACA CTC AAA	1949
Thr Pro Ser Ile Ser Glu Lys Lys Gly Thr Asn Ala Val Thr Leu Lys	
585 590 595	
GTT CGG AAG AAG AAT GTT TAT CTT AAA GTC AGG GAA ATT ATG GAC AAC	1997
Val Ala Lys Lys Asn Val Tyr Leu Lys Val Lys Glu Ile Met Asp Asn	
600 605 610	
ATA GAG TCC CTA CAT CGC CCC TCG GTT CTC AGG GGA TTC TTC GAA CGC	2045
Ile Glu Ser Leu His Ala Pro Ser Val Leu Arg Gly Phe Phe Glu Glu	
615 620 625 630	
GAC GGT TCA GTA MAC AGG GTT AGG AGG AGT ATT GTT CCA ACC CAG CCT	2093
Asp Gly Ser Val Asn Arg Val Arg Arg Ser Ile Val Ala Thr Gln Gly	
635 640 645	
ACA AAG AAC GAG TGG AAG ATT AAA CTG CTG TCA AAA CTG CTC TCC CAG	2141
Thr Lys Asn Glu Trp Lys Ile Lys Leu Val Ser Lys Leu Leu Ser Gln	
650 655 660	
CTT CGT ATC CCT CAT GAA ACC TAC ACG TAT CAG TAT CAG GAA AAT CGG	2189
Leu Gly Ile Pro His Gln Thr Tyr Thr Tyr Gln Tyr Lys Asn Glu Asn Gly	
665 670 675	
AAA GAT CGG AGC TAT ATA CTG GAG ATA ACT GGA AAG GAC CGA TTG	2237
Lys Asp Arg Ser Arg Tyr Ile Leu Glu Ile Thr Gly Lys Asp Gly Leu	
680 685 690	
ATA CTG TTC CAA ACA CTC ATT GGA TTC ATC AGT GAA AGA AAG AAC CCT	2285
Ile Leu Phe Gln Thr Leu Ile Gly Phe Ile Ser Glu Arg Lys Asn Ala	
695 700 705 710	
CTG CTT AAT AAG GCA ATA TCT CAG AGG GAA ATG AAC AAC AAC TTG GAA AAC	2333
Leu Leu Asn Lys Ala Ile Ser Gln Arg Glu Met Asn Asn Leu Glu Asn	
715 720 725	
AAT GGA TTT TAC AGG CTC AGT GAA TTC AAT GTC ACC AGC GAA TAC TAT	2381
Asn Gly Phe Tyr Arg Leu Ser Glu Phe Asn Val Ser Thr Glu Tyr Tyr	
730 735 740	
CAG CGC AAC GTC TAT GAC TTA ACT CTT GAA CGA ACT CCC TAC TAC TTT	2429
Glu Gly Lys Val Tyr Asp Leu Thr Leu Glu Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe	
745 750 755	
CCC AAT GGC ATA TTG ACC CAT AAC TCC CTG TAC CCC TCA ATC ATC ATC	2477
Ala Asn Gly Ile Leu Thr His Asn Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile	

33	760	765	770	34
ACC CAC AAC GTC TCG CGG GAT ACG CTC AAC AGA GAA CGA TCC AAG GAA	2525			
Thr His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Glu Cys Lys Glu				
775	780	785	790	
TAT GAC GTT GCC CCA CAG GTC CGC CAC CGC TTC TCC AAG GAC TTC CCA	2573			
Tyr Asp Val1 Ala1 Pro Gln Val1 Glu His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro				
795	800	805		
CGA TTT ATC CGG AGC CTG CTT GGA GAC CTC CTA GAG GAG AGG CAG AAG	2621			
Gly Phe Ile Pro Ser Leu Leu Glu Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys				
810	815	820		
ATA AAG AAG AAG ATG AAG CCC ACC ATT GAC CCG ATC GAG AGG AAG CTC	2669			
Ile Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu				
825	830	835		
CTC GAT TAC AGG CAG AGG CCC ATC AAG ATC CTG GCA AAC AGC ATC CTA	2717			
Ile Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Ile Leu				
840	845	850		
CCC GAG GAA TGG CTT CCA GTC CTC GAG GAA CGG GAG GTT CAC TTC GTC	2765			
Pro Glu Glu Trp Leu Pro Val Leu Glu Glu Gly Glu Val His Phe Val				
855	860	865	870	
AGG ATT GGA GAG CTC ATA GAC CGG ATG ATG GAG GAA AAT CCT CGG AAA	2813			
Arg Ile Glu Glu Val Ile Asp Arg Met Met Glu Glu Asn Ala Glu Lys				
875	880	885		
GTA AAG AGA GAG CGC GAG ACC GAA GTG CTT GAG GTC AGT GGG CTT GAA	2861			
Val Lys Arg Glu Glu Glu Thr Glu Val Leu Glu Val Ser Glu Leu Glu				
890	895	900		
GTC CGG TCC TTT AAC ACC AGA ACT AAC AAG CCC GAG CTC AAC AGA GTC	2909			
Val1 Pro Ser Phe Asn Arg Arg Thr Asn Lys Ala Glu Leu Lys Arg Val				
905	910	915		
AAG GCC CTG ATT AGG CAC GAT TAT TCT GCC AAG GTC TAC ACC ATC AGA	2957			
Lys Ala Leu Ile Arg His Asp Tyr Ser Glu Lys Val Tyr Thr Ile Arg				
920	925	930		
CTG AAG TCG GGG AGG AGA ATA AAG ATA ACC TCT GCC CAC ACC CTC TTC	3005			
Leu Lys Ser Glu Arg Arg Ile Lys Ile Thr Ser Glu His Ser Leu Phe				
935	940	945	950	
TCT GTG AGA AAC CGG GAG CTC GTT GAA GTT ACC GCC GAT GAA CTA AAG	3053			
Ser Val1 Arg Asn Glu Glu Leu Val1 Glu Val1 Thr Glu Asp Glu Leu Lys				
955	960	965		
CCA CGT GAC CTC GTT GCA GTC CGG CGG AGA TTG GAG CTT CCT GAG AGA	3101			
Pro Glu Asp Leu Val1 Ala Val1 Pro Arg Arg Leu Glu Leu Pro Glu Arg				
970	975	980		
AAC CAC GTG CTG AAC CTC GTT GAA CTG CTC CTT GGA ACC CCA GAA GAA	3149			
Asn His Val1 Leu Asn Leu Val1 Glu Leu Leu Glu Gly Thr Pro Glu Glu				
985	990	995		
GAA ACT TTG GAC ATC GTC ATG ACG ATC CCA GTC AAG GGT AAG AAG AAC	3197			
Glu Thr Leu Asp Ile Val1 Met Thr Ile Pro Val1 Lys Glu Lys Lys Asn				
1000	1005	1010		
TTC TTT AAA CGG ATG CTC ACC ACT TTG CGC TGG ATT TTC CGA GAG GAA	3245			
Phe Phe Lys Glu Met Leu Arg Thr Leu Arg Trp Ile Phe Glu Glu Glu				
1015	1020	1025	1030	
AAG AGG CCC AGA ACC CGG AGA CGC TAT CTC AGG CAC CTT GAG GAT CTC	3293			

Lys Arg Pro Arg Thr Ala Arg Arg Tyr Leu Arg His Leu Glu Asp Leu
 1035 1040 1045
 CGC TAT GTC CGG CTT AAC AAG ATC GGC TAC GAA GTC CTC GAC TGG GAC 3341
 Gly Tyr Val Arg Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Val Leu Asp Trp Asp
 1050 1055 1060
 TCA CTT AAC AAC TAC AGA AGG CTC TAC GAG CGG CTT GTC GAG AAC GTC 3389
 Ser Leu Lys Asn Tyr Arg Arg Leu Tyr Glu Ala Leu Val Glu Asn Val
 1065 1070 1075
 AGA TAC AAC GGC AAC AAG AGG GAG TAC CTC GTT GAA TTC AAT TCC ATC 3437
 Arg Tyr Asn Gly Asn Lys Arg Glu Tyr Leu Val Glu Phe Asn Ser Ile
 1080 1085 1090
 CGG GAT GCA GTT GGC ATA ATG CCC CTA AAA GAG GAG GAG TGG AAG 3485
 Arg Asp Ala Val Gly Ile Met Pro Leu Lys Glu Leu Lys Glu Trp Lys
 1095 1100 1105 1110
 ATC GGC ACG CTG AAC GGC TTC AGA ATG AGA AAG CTC ATT GAA GTG GAC 3533
 Ile Gly Thr Leu Asn Gly Phe Arg Met Arg Lys Leu Ile Glu Val Asp
 1115 1120 1125
 GAG TGG TTA GCA AAC CTC CTC CGC TAC TAC GTG ACC GAG CGC TAT GCA 3581
 Glu Ser Leu Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Tyr Val Ser Glu Gly Tyr Ala
 1130 1135 1140
 AGA AAG CAG AGG ATT CCC AAA AAC GGC TGG ACC TAC AGC GTG AAG CTC 3629
 Arg Lys Glu Arg Asn Pro Lys Asn Gly Trp Ser Tyr Ser Val Lys Leu
 1145 1150 1155
 TAC AAC GAA GAC CCT GAA GTC CTC GAC GAT ATG GAG AGA CTC CGC ACC 3677
 Tyr Asn Glu Asp Pro Glu Val Leu Asp Asp Met Glu Arg Leu Ala Ser
 1160 1165 1170
 AGG TTT TTC CGG AAG GTG ACC CGG CGC AGG AAC TAC GTT GAG ATA CGG 3725
 Arg Phe Phe Gly Lys Val Arg Arg Gly Arg Asn Tyr Val Glu Ile Pro
 1175 1180 1185 1190
 AAG AAG ATC GGC TAC CTC CTC ATT GAG AAC ATG TCC GGT GTC CTA CGG 3773
 Lys Lys Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Glu Asn Met Cys Gly Val Leu Ala
 1195 1200 1205
 GAG AAC AAG AGG ATT CCC GAG TTC GTC TTC ACC CGG AAA CGG GTT 3821
 Glu Asn Lys Arg Ile Pro Glu Phe Val Phe Thr Ser Pro Lys Glu Val
 1210 1215 1220
 CGG CTG CGC TTC CTT GAG GGG TAC TCA TCG CGG ATG CGG ACC TCC ACC 3869
 Arg Leu Ala Phe Leu Glu Gly Tyr Ser Ser Ala Met Ala Thr Ser Thr
 1225 1230 1235
 GAA CAA GAG ACT CAG CCT CTC AAC GAA AAG CGA GCT TTA CGG AAC CAG 3917
 Glu Glu Glu Thr Glu Ala Leu Asn Glu Lys Arg Ala Leu Ala Asn Glu
 1240 1245 1250
 CTC GTC CTC CTC TTG AAC TCG GTG CGG GTC TCT GCT GTC AAA CTT CGG 3965
 Leu Val Leu Leu Asn Ser Val Gly Val Ser Ala Val Lys Leu Glu
 1255 1260 1265 1270
 CAC GAC AGC CGG GTT TAC AGG GTC TAT ATA AAC GAG GAG CTC CGG TTC 4013
 His Asp Ser Glu Val Tyr Arg Val Tyr Ile Asn Glu Glu Leu Pro Phe
 1275 1280 1285
 GTC AAG CTG GAC AAG AAA AAG AAC CCC TAC TAC TCA CAC GTG ATC CCC 4061
 Val Lys Leu Asp Lys Lys Lys Asn Ala Tyr Tyr Ser His Val Ile Pro
 1290 1295 1300

AAG GAA GTC CTG AGC GAG GTC TTT CGG AAG GTT TTC CAG AAA AAC GTC 4109
 Lys Glu Val Leu Ser Glu Val Phe Glu Lys Val Phe Glu Lys Asn Val
 1305 1310 1315
 AGT CCT CAG ACC TTC AGG AAG ATG GTC GAG GAC GCA AGA CTC GAT CCC 4157
 Ser Pro Glu Thr Phe Arg Lys Met Val Glu Asp Glu Arg Leu Asp Pro
 1320 1325 1330
 GAA AAG CCC CAG AGG CTC TCC TGG CTC ATT GAG CGG GAC GTC GTC CTC 4205
 Glu Lys Ala Glu Arg Leu Ser Trp Leu Ile Glu Glu Asp Val Val Leu
 1335 1340 1345 1350
 GAC CCC GTT GAG TCC GTT GAT GTG GAA GAC TAC GAT CGT TAT GTC TAT 4253
 Asp Arg Val Glu Ser Val Asp Val Glu Asp Tyr Asp Glu Tyr Val Tyr
 1355 1360 1365
 GAC CTG AGC GTC CAG AAC GAG AAC TTC CTC ATT GGC TTT GGG TTG 4301
 Asp Leu Ser Val Glu Asp Asn Glu Asn Phe Leu Val Glu Phe Glu Leu
 1370 1375 1380
 GTC TAT GCT CAC AAC AGC TAC TAC TAC TAC CCC TAT GCA AGG CCC 4349
 Val Tyr Ala His Asn Ser Tyr Tyr Glu Tyr Tyr Ala Arg Ala
 1385 1390 1395
 CCC TGG TAC TCC AAG GAG TGT GCA GAG AGC GTA AGC GCC TGG GCA AGG 4397
 Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser Val Thr Ala Trp Glu Arg
 1400 1405 1410
 GAG TAC ATA ACG ATG ACC ATC AAC GAG ATA GAG GAA AAG TAC GGC TTT 4445
 Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile Glu Glu Lys Tyr Glu Phe
 1415 1420 1425 1430
 AAG GTC ATC TAC ACC GAC ACC GCA TTT TTT CCC ACA ATA CCT GCA 4493
 Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Glu Phe Phe Ala Thr Ile Pro Gly
 1435 1440 1445
 CCC GAT GCT GAA ACC GTC AAA AAG AAG CCT ATG GAG TTC CTC AAC TAT 4541
 Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Ala Met Glu Phe Leu Asn Tyr
 1450 1455 1460
 ATC AAC CCC AAA CTT CCG CCC CGG CTT GAG TAC GAG CCC TTC 4589
 Ile Asn Ala Lys Leu Pro Glu Ala Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Glu Phe
 1465 1470 1475
 TAC AAA CCC CGC TTC CTC ACG AAC GAG AAG TAT CGG GTG ATA GAC 4637
 Tyr Lys Arg Glu Phe Phe Val Thr Lys Lys Tyr Tyr Ala Val Ile Asp
 1480 1485 1490
 GAG GAA GGC AAG ATA ACA ACC CCC GGA CTT GAG ATT GTG AGG CGT GAC 4685
 Glu Glu Glu Lys Ile Thr Thr Arg Glu Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp
 1495 1500 1505 1510
 TGG ACC GAG ATA CGG AAA CAQ ACC CAG CAG CGG AGG GTT CTT GAA CCT TTG 4733
 Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Leu
 1515 1520 1525
 CTA AAG GAC GGT GAC GTC GAG AAG GCC GTG AGG ATA GTC AAA GAA GTC 4781
 Leu Lys Asp Glu Asp Val Glu Lys Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val
 1530 1535 1540
 ACC GAA AAG CTG AGC AGG TAC GAG GTT CGG CGG GAG AAG CTG GTG ATC 4829
 Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Pro Glu Lys Leu Val Ile
 1545 1550 1555
 CAC GAG CAG ATA ACG ACC GAT TTA AAG GAC TAC AAG GCA ACC CGT CCC 4877
 His Glu Glu Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Lys Ala Thr Glu Pro

(21)

特開平10-42874

【0080】配列番号：2

配列の長さ：774

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

*

配列

Met	Ile	Leu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Glu	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Ile	
1															15	
Arg	Ile	Phe	Lys	Glu	Asn	Gly	Glu	Phe	Lys	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg		
		20						25				30				
Thr	Phe	Glu	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Ser	Ala	Ile	
		35					40						45			
Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Ile	Thr	Ala	Ala	Glu	Arg	His	Gly	Thr	Val	Val	Ile
		50				55						60				
Val	Lys	Arg	Val	Glu	Lys	Val	Gln	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Arg	Pro	Val	
		65				70						75			80	
Glu	Val	Trp	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Pro	Gln	Asp	Val	Pro	Ala	Ile	
								85		90				95		
Arg	Asp	Lys	Ile	Arg	Glu	His	Gly	Ala	Val	Ile	Asp	Ile	Tyr	Glu	Tyr	
								100		105			110			
Asp	Ile	Pro	Ph	Ala	Lys	Arg	Tyr	Leu	Ile	Asp	Lys	Gly	Leu	Val	Pro	
								115		120			125			
Met	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	Leu	Lys	Met	Leu	Ala	Phe	Asp	Ile	Glu	Thr	
								130		135			140			
Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala	Glu	Gly	Pro	Ile	Leu	Met	Ile		
								145		150			155		160	
Ser	Tyr	Ala	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Arg	Val	Ile	Thr	Trp	Lys	Asn	Val	
								165		170			175			
Asp	Leu	Pro	Tyr	Val	Asp	Val	Val	Ser	Thr	Glu	Arg	Glu	Met	Ile	Lys	
								180		185			190			

41

Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
 195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
 210 215 220

Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
 275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Pro Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn
 290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335

Ile Gln Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350

Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365

Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
 370 375 380

Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
 385 390 395 400

Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
 405 410 415

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
 420 425 430

Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
 435 440 445

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
 450 455 460

Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
 465 470 475 480

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr
 485 490 495

Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
 500 505 510

Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile
 515 520 525

Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
 530 535 540

Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
 545 550 555 560

Met Glu Phe Leu Asn Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
 565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
 580 585 590

43

44

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
 705 710 715 720
 Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
 725 730 735
 Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gln Tyr Arg Lys
 740 745 750
 Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Glu Ser Ala Trp
 755 760 765
 Leu Lys Pro Lys Gly Thr
 770

【0081】配列番号：3

＊ 鎮の数：2本鎮

配列の長さ：2325

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸（DNA）

＊ 配列の種類：genomic DNA

配列

ATGATCCTCG ACACATGACTA CATAACCGAG GATGAAAAGC CTGTCATAAG AATTTCAGA 60
 AAGGAAAACG CCGAGTTAA GATTGAGTCAC GACCCGGACTT TTGACCCCTA CTTCCTAGCC 120
 CTCTTCAGG AGCGATTCTGG CATTGAGGA GTCAAGAAGA TAACCCGGCA GAGCCACGGG 180
 ACGGTTGTAA CGGTAAAGCCG CGTTAAAGAAG GTTCAGAAGA AGTTCCCTGG GAGCACAGTT 240
 GAGGTCCTGG AACTCTCATCT TACTCTCCG CAGGAGCTTC CAGGGATAAG GGACAAGATA 300
 CGGAGGATG CAGGAGTATG TGACACTTCAG GAGTACGACA TACCCCTTCCG CAAACCCCTAC 360
 CTCTAGACA AGGGATTAGT GCGAATGGAA GCGCAGCAGG AGCTGAAAAT GCTCCCTTC 420
 GACATTCAA CTCTTCTACCA TGAGGCGCGAG GAGTTGGCGG AGGGGCAAT CCTTATGATA 480
 AGCTTACCGG CGACGGAGG GCGGAGGCTT ATAACCTTGA AGACCTTGAAG TCTCCCTAC 540
 GTTGAGGTCG TCTCGAGGAG GAGGAGATG ATAANACCTT TCCCTCGTGT TGTGAGGG 600
 AAAGACCGGG AGCTTCTCAT ATACCTACAA GCGGCAACT TCGACTTCTC CTATCTAA 660
 AAGCCCTGTG AAAACCTCGG AATAAACCTTC GCGCTCGAA CGGATGGAAG CGACCCGAAG 720
 ATTGAGAGGA TGGGGGAGAC GTTCCCTGTC GAAGTGAAGG GACGGATACA CTTCATCTC 780
 TATCCCTGTGA TAAGACGGAC GATAAACCTG CCCACATACA CCGCTTGAGGC CGTTTATGAA 840
 CGCGCTCTCG GTCAAGGGAA GGAGGAGCTT TACCCCTGAGG AAATAACACCC AGCTCTGGAA 900
 ACCGGGGAGA ACCTTGAGAG AGTCCCGCCCG TACTCTGAGG AAAGATGGAA CGTCACATAC 960
 GAGCTTGGGA AGGAGGCTT TCCGATGGAG GCGGAGCTT CTCCGCTTAAAT CGGCCAGTCC 1020
 CTCTGGGAGG TCTCCCGCTC CAGGACTTCG ACCTCTGTTG AGTGTCTCTCCTCAGGAG 1080
 CGCTATGAGA CGGATGAGCTT CGCCCGAAC AACCCCCGATG AAAAGGAGCTT CGCCACAGA 1140
 CGGGAGGCTT ATGAGGAGG CTATGAAAGA GAGGGGGAGA GAGGGTTGAG CGAGAACATA 1200
 GTGTAAGCTAG ATTTTGTAGTC CTCTGACCCCG TCAATCATCA TCAACCCACAA CGCTCTCCCC 1260
 GATACCGCTCA ACAGAGAAGG ATGCAAGGAA TATGAGGTTG CCCCCACAGGT CGGCCACCCG 1320

45

46

TTCTGCAGG ACTTCCCAGG ATTATTCGGG AGCTCTCTTG GAGACCTCTT AGAGGAGAGG 1380
 CAGAAGATAA AGAAGAGAT GAAGGAGGAG ATTGACCGA TCCGAGAGAA CCTCCCTGGAT 1440
 TACAGGAGA GGGCATCAA GATCTGGCA AACAGCTACT AGCGTTACTA CGCGTATGCA 1500
 AGGGCCCGCT CGTACTGCA GAGCTTGCA GAGACCGTAA CGCCCTGGG AAAGGGATAC 1560
 ATAACGATGA CCATCAAGGA GATAGAGGA AAGTACGGCT TTAACTGATAT CTACACCCAC 1620
 ACCGACGGAT TTTTTGCCAA AACATCTGGA CCCGATCTG AAACCGTCAA AAAGAAGGCT 1680
 ATGGAGTTCC TCAACTATAT CAACGGCCAA CTTCGGGGCG CCCTTGAGCT CGAGTACGAG 1740
 CGCTTCTACA AACGGGGCTT CTTCGTCAGG AAGAGAGT ATCCGGTGT AGACGGAGGA 1800
 CGAAAGATAA CAACGGGGCTT ACTTGAGATT GTGAGGGCTG ACTGGACCGA TAGACCGAA 1860
 GAGACCCAGG CGAGGGCTCT TGAAGCTTC CTAAAGGAGC GTGACCTGGA GAAGGGCGTG 1920
 AGGATAGTCA AAGAAGGTTAC CGAAAGCTG ACCAAGTAC AGGTTCGGGG GGAAAGACTG 1980
 GTGATCCAGG AGGAGATTA AACGGATTAA AACGACTACA AGGCAACCCG TCCCCACGGT 2040
 CGCGTGGCA AGACGGTTCG CGCGAGAGGA GTCAAATAC CGCCCTGGCA CGTGATAAGC 2100
 TACATCGTC TCAAGGGCTC TGGGAGGATA CGGACACGG CGATACGGT CGACGGACTC 2160
 GACCCGAGGA AGGACAAGTA CGACCCCGAG TACTACATG AGAACCCAGT TCTCCACCC 2220
 GTTGAAGAGA TTCTGAGAGC CTTCGGTAC CGCGAAGGAG ACCTGGCTTA CGAGAGAGG 2280
 AGACGGTTG GTTCTGAGTC TTGGCTGAAG CGGAAGGCAA CTGCA 2325

【0082】配列番号: 4

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CTTTCTCTCA GATCTCTCTT CCTG 24

【0083】配列番号: 5

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CAGGAAGAA GATCTGAGCA AAAG 24

【0084】配列番号: 6

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CTGAAAATCC TCCGCCCTCCC GATTGAACT CTCTAC 36

【0085】配列番号: 7

配列の長さ: 33

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CTGAAAATCC TCCGCCCTCCC GATTGAACT CTCT 34

【0086】配列番号: 8

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸 (DNA)

20 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CCCCCTGGTGG TAGAGAGTTG CAATGTCGAA 30

【0087】配列番号: 9

配列の長さ: 32

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

30 配列の種類: 合成DNA

配列

CGGACTGACT GATAACGTAC GACCGTGACA AC 32

【0088】配列番号: 10

配列の長さ: 33

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CTTGTGAGAGA GTCCGGGGCT TCTCCGATGGA AGA 33

【0089】配列番号: 11

配列の長さ: 35

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

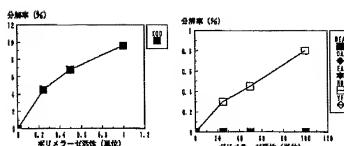
TGCTCTGACCA AGGAACCCAC AGTTGATTAG CAGAG 35

【0090】配列番号: 12

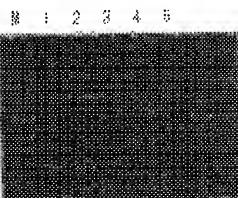
50 配列の長さ: 35

47	配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 ATAAGAGGTC CCAAGACTTA GTACCTGAAAG GGTGA	36	【0 0 9 1】配列番号：13 配列の長さ：24 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 CCCCAGGGTT TCCCCAGTC CGAC	24	【0 0 9 2】配列番号：14 配列の長さ：24 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 CTTTGCTCA GATCTCTTCTT CCTG	24	【0 0 9 3】配列番号：15 配列の長さ：36 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 ACCTGAAAT GCTACCCCTTC GACAATGAAA CTCTCT	36	【0 0 9 4】配列番号：16 配列の長さ：36 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 ACCTGAAAT GCTACCCCTTC GACAGAGAAA CTCTCT	36	【0 0 9 5】配列番号：17 配列の長さ：33 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 GAAATGCTC CCCTTGATC AAGAACTCT CTA	33	【0 0 9 6】配列番号：18 配列の長さ：36 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 ACCTGAAAT GCTACCCCTTC GACCATGAAA CTCTCT	36	【0 0 9 7】配列番号：19 配列の長さ：30 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 CCTCTTCAC ATTGAAGTAC TCTTACCATGA	30	【0 0 9 8】配列番号：20 配列の長さ：36 10 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 AGCTGAAAT GCTACCCCTTC GACAGAGAAA CTCTCT	36	【0 0 9 9】配列番号：21 配列の長さ：36 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 20 配列の種類：合成D N A 配列 AGCTGAAAT GCTACCCCTTC GACAAAGAAA CTCTCT	36	【0 1 0 0】配列番号：22 配列の長さ：35 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 AAAAGACT CACAGTCAC AGAAAAGCAT CTTAC	35	【0 1 0 1】配列番号：23 配列の長さ：34 配列の型：核酸（D N A） 鎖の数：1本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：合成D N A 配列 AAAAGACT CAACAGATC ATTCTTGAGA ATAGT	34	【図面の簡単な説明】 【図1】改変型D N Aポリメラーゼのポリメラーゼ活性とD N A分解率を示す図である。 【図2】改変型D N Aポリメラーゼの熱安定性を示す図である。 40 【図3】D N Aポリメラーゼ組成物を用いたP C R（ヒトゲノム）の結果を示す図である。 【図4】耐熱性D N Aポリメラーゼのエキソ（E X O）領域のアミノ酸配列を示す図である。 【図5】改変型D N Aポリメラーゼのポリメラーゼ活性とD N A分解率を示す図である。 【図6】天然型KODポリメラーゼとのエキソヌクレアーゼ活性の比率を示す図である。
----	--	----	--	----	---	----	--	----	--	----	--	----	--	----	---	----	---	----	---	----	--	----	--	----	---

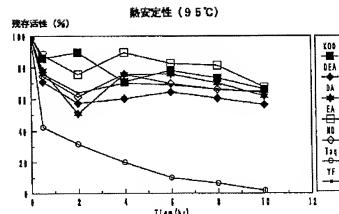
【図1】



【図3】



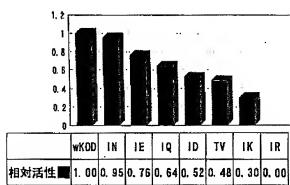
【図2】



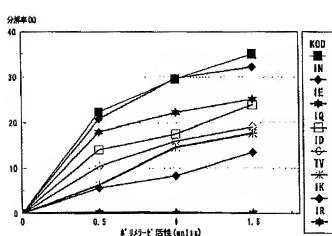
【図4】

KOD	IN	IE	IQ	ID	TV	IR
MAFDIETLY	LTITNGGDFPANLKKK	VARYSMEADAY				
PLAFDIELY	LTITNGGDFPMLAKK	VARYSMEADAY				
VLAFDIELY	LTITNGGDFPMLKX	VARYSMEADAY				
Deep Vinyl	LTITNGGDFPMLPKX	VARYSMEADAY				

【図6】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成8年9月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図3

* 【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】 DNAポリメラーゼ組成物を用いたPCR

* (ヒトゲノム) の結果を示す電気泳動の写真である。

フロントページの続き

(72)発明者 川上 文清

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 高木 昌宏

大阪府吹田市青山台1-3 C-58-207

(72)発明者 今中 忠行

大阪府吹田市藤白台2丁目28番11号